



Micropropagation assisted by biosynthesized zinc oxide nanoparticles in *Agave applanata*

Micropropagación asistida con nanopartículas biosintetizadas de óxido de zinc en *Agave applanata*

Ana Itzel Canales-Mendoza¹, Maricela Villanueva-Ibáñez^{1*}, Yuridia Mercado-Flores²

¹Laboratorio de Nanotecnología, Sistemas Biológicos y Aplicaciones industriales, Universidad Politécnica de Pachuca, Zempoala, 43830, Hidalgo, Mexico.

²Laboratorio de Agrobiotecnología, Universidad Politécnica de Pachuca, Zempoala, 43830, Hidalgo, Mexico.

*Corresponding author

E-mail address: villanueva@upp.edu.mx (M. Villanueva-Ibáñez)

Article history:

Received: 16 February 2026 / Received in revised form: 15 May 2026 / Accepted: 15 July 2026 / Published online: 26 July 2026.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2026.11.3.1-25>

ABSTRACT

Nanoparticles in plant biotechnology are recognized for their ability to enhance regeneration, induce callus formation, and control microorganisms. *Agave applanata*, an endemic Mexican species of ecological and economic importance, has propagation difficulties due to its limited natural reproduction. This study evaluated its in vitro multiplication in a culture medium supplemented with biosynthesized zinc oxide nanoparticles (ZnONPs). The ZnONPs, obtained using the cell-free filtrate of *Mucor fragilis* as a reducing agent, showed an average size of 87 ± 14 nm and a semi-spherical morphology. After 45 days of culture, the number and average length of shoots were evaluated. The main factors and their interactions had significant effects, indicating that regeneration was influenced by the combined action of growth regulators and ZnONPs. The center-point treatments produced the highest proliferation, with 25.6 ± 1.67 shoots per explant, whereas the combination of 0.025 mg L^{-1} 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 5.0 mg L^{-1} 6-benzylaminopurine promoted the greatest elongation, reaching 2.94 ± 0.11 cm. In addition, treatments with ZnONPs also reduced

microbial contamination. These results highlight the biostimulant and antimicrobial potential of biosynthesized ZnONPs for improving the micropropagation of endemic agaves.

Keywords: *Agave applanata*, *in vitro* multiplication, micropropagation, nanoparticles, zinc oxide.

RESUMEN

Las nanopartículas en biotecnología vegetal se reconocen por su capacidad para mejorar la regeneración, inducir callos y controlar microorganismos. *Agave applanata*, especie mexicana endémica de relevancia ecológica y económica, presenta dificultades de propagación por su reproducción natural limitada. Este estudio evaluó su multiplicación *in vitro* en un medio de cultivo suplementado con nanopartículas biosintetizadas de óxido de zinc (ZnONPs). Las ZnONPs, obtenidas con filtrado libre de células de *Mucor fragilis* como agente reductor, presentaron un tamaño promedio de 87 ± 14 nm y morfología semiesférica. Después de 45 días de cultivo, se evaluaron el número y la longitud promedio de los brotes. Los factores principales y sus interacciones tuvieron efectos significativos, lo que indica que la regeneración estuvo influenciada por la acción combinada de los reguladores de crecimiento y las ZnONPs. Los tratamientos del punto central produjeron la mayor proliferación, con 25.6 ± 1.67 brotes por explante, mientras que la combinación de 0.025 mg L^{-1} de 2,4-diclorofenoxiacético y 5.0 mg L^{-1} de 6-bencilaminopurina promovió la mayor elongación, con 2.94 ± 0.11 cm. Además, los tratamientos con ZnONPs disminuyeron la contaminación microbiana. Estos resultados evidencian el potencial bioestimulante y antimicrobiano de las ZnONPs biosintetizadas para mejorar la micropropagación de agaves endémicos.

Palabras clave: *Agave applanata*, micropropagación, multiplicación *in vitro*, nanopartículas, óxido de zinc.

1. Introducción

Agave applanata es una especie endémica de México cuya distribución silvestre se limita a pocos estados, entre ellos Hidalgo. Además de su importancia ecológica dentro de los ecosistemas semiáridos, también forma parte del patrimonio biocultural de las comunidades rurales, ya que tradicionalmente es asociada a usos alimentarios y como materia prima para la elaboración de diversos productos. Aunque el género *Agave* ha sido ampliamente reconocido por su importancia productiva y ecológica, los estudios enfocados específicamente en *A. applanata* son aún limitados. Un aspecto particularmente relevante de esta especie es su asociación con el insecto comestible *Comadia redtenbacheri*, conocido regionalmente como chinicuil o gusano rojo del maguey. Este insecto constituye un recurso gastronómico de alto valor comercial debido a su elevado contenido de proteínas, ácidos grasos esenciales y fibra, por lo que su aprovechamiento representa una fuente importante de ingresos para numerosas comunidades del centro de México (Molina-Vega *et al.*, 2021; García-Montes *et al.*, 2025). En este contexto, la entomofagia ha adquirido un interés creciente como alternativa sostenible para la producción de alimentos

con menor impacto ambiental y como estrategia potencial para contribuir a la seguridad alimentaria mundial (Romero-Jiménez *et al.*, 2025).

En las regiones del Valle del Mezquital y del Altiplano, *A. applanata* ha adquirido importancia económica local debido a su relación con la colecta del chinicuil. No obstante, la demanda comercial de este insecto ha fomentado prácticas de extracción que han reducido las poblaciones naturales de agave, cuyo aprovechamiento no sustentable afecta directamente su conservación. La recolección de las larvas suele implicar la remoción total de la planta antes de su floración, lo que interrumpe su ciclo reproductivo y reduce la regeneración natural. Además, la falta de replantación y de trazabilidad en la recolección ha ocasionado una disminución en el número de larvas recolectadas y en la densidad de plantas en su hábitat (Reynoso-Santos *et al.*, 2012; Ávila *et al.*, 2017; Llanderal-Cázares *et al.*, 2017; García-Montes *et al.*, 2025).

Los agaves suelen presentar ciclos de vida prolongados, que en algunas especies pueden extenderse entre ocho y diez años antes de la floración. Se propagan tanto por vía vegetativa, mediante hijuelos o estolones, así como por reproducción sexual a través de semillas. No obstante, en poblaciones silvestres de *A. applanata*, la reproducción sexual está limitada debido a la remoción prematura de las plantas y del escapo floral, lo que reduce la regeneración natural y compromete la permanencia de la especie en su hábitat (García-Mendoza, 2007; Ángeles *et al.*, 2017). Esta situación amenaza a la especie, lo que resalta la necesidad de estrategias de conservación y multiplicación controlada.

Ante este panorama, la micropropagación *in vitro* ofrece una alternativa biotecnológica útil para conservar y multiplicar de manera sustentable especies vegetales de interés económico y ecológico. En agaves, se han desarrollado protocolos para diversas especies: *A. fourcroydes* (Abreu *et al.*, 2016), *A. potatorum* (Bautista-Castellanos *et al.*, 2021), *A. guiengola* (Chávez-Ortiz *et al.*, 2020) y *A. maximiliana* (Santacruz-Ruvalcaba *et al.*, 2022). Estos trabajos indican que la elección adecuada de reguladores de crecimiento y las condiciones fisicoquímicas del medio son determinantes para lograr una regeneración eficiente *in vitro*. Las condiciones críticas incluyen un pH entre 5.2 y 6.5, temperatura de 24-28 °C, fotoperiodo de 16:8 h de luz/oscuridad y calidad lumínica controlada (Sánchez-Madrid *et al.*, 2016; Cardoso *et al.*, 2018; Espinosa-Leal *et al.*, 2018; Rodríguez-Aguilar *et al.*, 2021; Sudheer *et al.*, 2022). Sin embargo, la contaminación microbiana derivada de la manipulación o de la falta de equipamiento, junto con la baja capacidad regenerativa de algunas especies silvestres, continúan limitando la obtención de protocolos eficientes (Abdalla *et al.*, 2022).

En este contexto, la aplicación de nanopartículas en la biotecnología vegetal ha cobrado interés como estrategia para favorecer la regeneración, multiplicación y sanidad de los cultivos *in vitro*. En particular, las NPs biosintetizadas, provenientes de plantas, bacterias u hongos, han reemplazado los agentes químicos convencionales en los procesos de reducción, por ser más estables, biocompatibles y menos tóxicos (Hussain *et al.*, 2016; Alamilla-Martínez *et al.*, 2019; Balusamy *et al.*, 2023). Además, este tipo de síntesis puede modular características de tamaño, forma, estructura y recubrimiento de la superficie que confiere este tipo de síntesis han demostrado mejorar sus propiedades para aplicaciones en sistemas biológicos (Agarwal *et al.*, 2017).

En particular, las nanopartículas de óxido de zinc poseen propiedades fisicoquímicas relevantes, como una alta relación superficie/volumen, actividad antimicrobiana y potencial bioestimulante del crecimiento vegetal (Milani *et al.*, 2015; Elemike *et al.*, 2019; Bouhadi *et al.*, 2025). En medios de cultivo, se ha reportado que pueden inducir callogénesis, organogénesis y aumento en la producción de metabolitos secundarios (Prasad *et al.*, 2024; Gunasena *et al.*, 2024). No obstante, sus efectos dependen de la especie vegetal, la concentración empleada y la interacción con los reguladores de crecimiento, por lo que es necesario ajustar las condiciones para cada sistema de cultivo.

A pesar de los avances alcanzados en la micropropagación de diversas especies de *Agave*, hasta el momento no existen estudios que evalúen el efecto de nanopartículas biosintetizadas de óxido de zinc (ZnONPs) sobre la regeneración y multiplicación *in vitro* de *A. applanata*. La generación de protocolos que integren herramientas de la nanotecnología con técnicas de cultivo de tejidos representa una alternativa prometedora para incrementar la eficiencia de la propagación clonal y contribuir a la conservación de esta especie endémica.

Por lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto combinado del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), la 6-bencilaminopurina (BAP) y ZnONPs biosintetizadas mediante el filtrado libre de células de *Mucor fragilis* sobre la multiplicación *in vitro* de *A. applanata*. Para ello se empleó un diseño factorial 2^3 con puntos centrales, con el fin de identificar las condiciones experimentales que favorecen la regeneración de brotes y el desarrollo de un protocolo eficiente de micropropagación.

2. Materiales y métodos

2.1. Obtención de nanopartículas de óxido de zinc

Las ZnONPs se obtuvieron mediante síntesis biológica utilizando el hongo *M. fragilis*, siguiendo la metodología descrita por Canales-Mendoza (2023). El microorganismo se cultivó en matraces Erlenmeyer de 250 mL con 25 mL de medio YPDA (extracto de levadura 1 %, peptona de caseína 2 %, dextrosa 2 % y agar 2 %) y se incubó a 28 °C durante 120 h. Posteriormente, las esporas se recuperaron mediante la adición de 50 mL de agua desionizada estéril y agitación magnética a 200 rpm. La concentración de esporas se determinó mediante conteo en cámara de Neubauer. A partir de la suspensión obtenida, se inocularon 200 mL de medio YPD (extracto de levadura 1 %, peptona de caseína 2 % y dextrosa 2 %) hasta alcanzar una concentración final de 1×10^6 esporas mL⁻¹, incubándose a 28 °C y 120 rpm durante 72 h.

La biomasa fúngica se recuperó mediante filtración con papel Whatman No. 100 y se lavó tres veces con agua destilada estéril. Posteriormente, se resuspendió en agua estéril en una relación 1:10 (p/v) y se incubó nuevamente a 20 °C y 120 rpm durante 72 h. El sobrenadante obtenido se filtró primero con papel Whatman No. 100 y después a través de una membrana de nylon de 0.22 µm. El filtrado libre de células se utilizó para la biosíntesis de las nanopartículas.

La síntesis de las ZnONPs se realizó en frascos estériles de 60 mL con un volumen final de reacción de 50 mL. Se mezclaron 2.6 mL del filtrado libre de células con 35 mL de agua desionizada y se adicionó acetato de zinc hasta alcanzar una concentración final de 0.07 M. El pH se ajustó a 13 utilizando NaOH 1 M y la mezcla se mantuvo bajo agitación constante (200 rpm) durante 6 h a temperatura ambiente. La suspensión se filtró mediante una membrana de nylon de 0.22 μm y el sólido retenido se lavó tres veces con agua desionizada. Las membranas se secaron a temperatura ambiente durante 24 h y el polvo recuperado se almacenó en recipientes estériles para prevenir su contaminación antes de su incorporación al medio de cultivo. Las ZnONPs obtenidas se caracterizaron mediante espectroscopía Raman y microscopía electrónica de barrido (MEB).

El tamaño de partícula se determinó mediante análisis de imagen con el software ImageJ (National Institutes of Health, EUA), a partir de las micrografías obtenidas por MEB. Para ello, la escala de la imagen se calibró utilizando la barra de escala de la micrografía y se midió el diámetro de partículas individualmente resueltas ($n = 50$). Con estos valores se calcularon el tamaño promedio, la desviación estándar y la distribución de frecuencias de tamaño.

2.2. Desinfección y establecimiento *in vitro*

Las semillas de *A. applanata* se lavaron con agua corriente para eliminar impurezas superficiales y se desinfectaron por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio comercial al 25 % (v/v) durante 3 min. Después, se realizaron tres enjuagues consecutivos con agua destilada estéril durante 5 min cada uno.

Con el propósito de favorecer la imbibición y acelerar la germinación, se efectuó un corte parcial de la testa antes de la siembra. Las semillas se establecieron en recipientes de polipropileno de 250 mL que contenían 25 mL de medio basal Murashige y Skoog (MS) suplementado con vitaminas L2, sacarosa (30 g L⁻¹) y agar (8 g L⁻¹). El pH del medio se ajustó a 5.8 antes de la esterilización en autoclave a 121 °C y 1.05 kg cm⁻² durante 15 min (Murashige y Skoog 1962).

Los cultivos se incubaron en una cámara de crecimiento bajo condiciones controladas de temperatura (25 $\pm$ 2 °C), fotoperiodo de 16 h de luz y 8 h de oscuridad, con iluminación proporcionada por lámparas fluorescentes de luz blanca fría.

2.3. Evaluación de la germinación

La viabilidad de las semillas se evaluó mediante germinación *in vitro*. Se sembraron seis semillas por recipiente y se establecieron 17 repeticiones, para un total de 102 semillas evaluadas.

El porcentaje de germinación se determinó considerando como semilla germinada aquella que presentó la emergencia visible de la radícula. Las plántulas obtenidas se mantuvieron en crecimiento durante seis meses, hasta alcanzar un desarrollo adecuado del meristemo

basal. Posteriormente, se utilizaron como fuente de explantes para la etapa de multiplicación *in vitro*.

2.4. Multiplicación *in vitro* y diseño experimental

La multiplicación *in vitro* se realizó utilizando explantes obtenidos de la región meristemática basal de plántulas previamente establecidas. Bajo condiciones asépticas, se eliminó el sistema radical y se aisló la región basal que contenía el meristemo.

Para evaluar el efecto de los reguladores de crecimiento y de las nanopartículas de óxido de zinc sobre la regeneración de brotes se empleó un diseño factorial completo 2^3 con tres puntos centrales, lo que permitió estimar los efectos principales, las interacciones y la posible curvatura del sistema experimental.

Los factores evaluados fueron las concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 6-bencilaminopurina (BAP) y ZnONPs, cada uno en dos niveles: ausencia y presencia. Con ello se conformaron los ocho puntos factoriales del diseño 2^3 , incluido el control absoluto (vértice 0,0,0) sin reguladores de crecimiento ni nanopartículas). Adicionalmente, se incorporaron tres réplicas en el punto central (Tabla 1).

Cada tratamiento estuvo constituido por cinco unidades experimentales independientes (frascos de cultivo), cada una con dos explantes, para un total de diez explantes por tratamiento. Antes de su incorporación al medio de cultivo, las ZnONPs se dispersaron en agua destilada estéril mediante sonicación durante 15 min, con el fin de reducir la agregación y favorecer su distribución homogénea en el medio de cultivo.

Los explantes se cultivaron en recipientes de polipropileno con 10 mL de medio Murashige y Skoog (MS) suplementado con las concentraciones correspondientes de reguladores de crecimiento y ZnONPs de acuerdo con el diseño experimental. Los cultivos permanecieron durante 45 días a 25 ± 2 °C, bajo un fotoperiodo de 16 h luz/8 h oscuridad. Al finalizar el periodo de cultivo se evaluaron: número de brotes por explante; longitud promedio de los brotes (cm); vitrificación; contaminación microbiana; respuesta morfogénica.

Para las variables cuantitativas (número y longitud de brotes), los valores obtenidos de los dos explantes contenidos en cada frasco se promediaron antes del análisis estadístico, considerando el frasco como unidad experimental.

La vitrificación se evaluó individualmente en cada explante mediante la presencia de síntomas visibles de hiperhidricidad, como tejidos translúcidos, aspecto acuoso y deformación foliar. Los resultados se expresaron como el número de explantes afectados respecto al total evaluado por tratamiento ($n = 10$).

La contaminación se registró a nivel de unidad experimental (frasco), considerando contaminado cualquier recipiente con crecimiento visible de bacterias u hongos durante el periodo de cultivo. Los resultados se expresaron como el número de frascos contaminados respecto al total de frascos por tratamiento ($n = 5$).

La respuesta morfogénica se clasificó mediante observación visual en:

- i) organogénesis directa, cuando los brotes se originaron directamente a partir del tejido meristemático sin formación previa de callo;
- ii) organogénesis indirecta, cuando la regeneración de brotes estuvo precedida por la formación de tejido calloso;
- iii) callogénesis, cuando únicamente se observó proliferación de callo sin regeneración de brotes durante el periodo experimental.

Cada explante se clasificó en una única categoría morfogénica predominante al finalizar el periodo de cultivo. La frecuencia de cada respuesta se expresó como el número de explantes por categoría respecto al total evaluado por tratamiento (n = 10).

Tabla 1. Diseño factorial completo 2^3 con tres réplicas en el punto central para evaluar el efecto de 2,4-D, BAP y ZnONPs sobre la multiplicación *in vitro* de *A. applanata*.

Table 1. Full 2^3 factorial experimental design with three center-point replicates used to evaluate the effects of 2,4-D, BAP, and ZnONPs on *in vitro* multiplication of *A. applanata*.

Tratamiento	2,4-D (mg L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)	ZnONPs (mg L ⁻¹)	Tipo de punto
T1	0.000	0.0	0	Control absoluto
T2	0.025	0.0	0	Solo (2,4-D)
T3	0.000	5.0	0	Solo (BAP)
T4	0.000	0.0	100	Solo (ZnONPs)
T5	0.025	5.0	0	2,4-D + BAP
T6	0.025	0.0	100	2,4-D + ZnONPs
T7	0.000	5.0	100	BAP + ZnONPs
T8	0.025	5.0	100	2,4-D + BAP + ZnONPs (triple)
T9	0.0125	2.5	50	Punto central (Réplica 1)
T10	0.0125	2.5	50	Punto central (Réplica 2)
T11	0.0125	2.5	50	Punto central (Réplica 3)

Diseño factorial 2^3 (niveles bajo/alto: 2,4-D 0 y 0.025 mg L⁻¹; BAP 0 y 5 mg L⁻¹; ZnONPs 0 y 100 mg L⁻¹) más tres réplicas en el punto central (0.0125; 2.5; 50 mg L⁻¹).

2.5. Análisis estadístico

Los datos correspondientes al número de brotes y la longitud de brotes se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de acuerdo con un diseño factorial completo 2^3 con tres réplicas en el punto central. El análisis se realizó utilizando el software R (versión 4.5.2; R Core Team) en el entorno Rstudio con el paquete *agricolae* para la prueba de Tukey. En ambas variables, el promedio de los dos explantes de cada frasco se calculó antes del análisis, considerando el frasco como unidad experimental.

Se evaluaron los efectos principales de los factores 2,4-D, BAP y ZnONPs, así como las interacciones dobles (2,4-D × BAP, 2,4-D × ZnONPs y BAP × ZnONPs) y la interacción triple. Las tres réplicas del punto central se utilizaron para estimar el error puro y evaluar la

presencia de curvatura en la respuesta. La significancia de los efectos se determinó mediante ANOVA con un nivel de confianza del 95 % ($p \leq 0.05$). Cuando se detectó una curvatura significativa, esta se interpretó como evidencia de una relación no lineal entre los factores y la variable de respuesta, sin estimar términos cuadráticos individuales debido a la ausencia de puntos axiales en el diseño experimental. Las medias de los tratamientos se compararon mediante la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$).

La respuesta morfogénica y el porcentaje de callogénesis se analizaron de forma descriptiva entre tratamientos. La combinación de niveles de los factores que produjo la mayor respuesta biológica se consideró la condición experimental más favorable dentro de las condiciones evaluadas.

3. Resultados

3.1. Nanopartículas de óxido de zinc

Las nanopartículas de óxido de zinc biosintetizadas mediante el filtrado libre de células de *M. fragilis* presentaron una estructura cristalina hexagonal tipo wurtzita, lo cual fue confirmado por espectroscopía Raman.

En el espectro Raman (Figura 1) se identificó una banda intensa y bien definida en 430 cm^{-1} , correspondiente al modo vibracional $E_2(\text{alto})$, característico de la fase wurtzita del ZnO y asociado a la vibración de los átomos de oxígeno de la red. La elevada intensidad y definición de esa banda indican un alto grado de cristalinidad del material.

El ligero desplazamiento de esta banda respecto al valor reportado para el ZnO másico ($\sim 437\text{ cm}^{-1}$) puede asociarse con la reducción del tamaño de partícula, tensiones en la red cristalina o la presencia de defectos estructurales. La banda observada en 571 cm^{-1} se asignó al modo polar $A_1(\text{LO})$, cuya presencia se relaciona con la existencia de defectos en la red cristalina, principalmente vacancias de oxígeno y zinc intersticial, los cuales han sido reportados en ZnONPs obtenidas por rutas de síntesis biológica.

Finalmente, la señal de baja intensidad registrada en 328 cm^{-1} corresponde a un proceso Raman de segundo orden, atribuido a la diferencia entre los modos $E_2(\text{alto})$ y $E_2(\text{bajo})$, típico de materiales cristalinos de ZnO (Castro et al., 2017).

Las micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) revelaron la presencia de nanopartículas con morfología predominantemente semiesférica (Figura 2). El análisis de tamaño de partícula, realizado mediante mediciones individuales sobre las micrografías con el software ImageJ ($n = 50$), arrojó un tamaño promedio de $87 \pm 14\text{ nm}$, con un intervalo de 54 a 117 nm (Figura 2b).

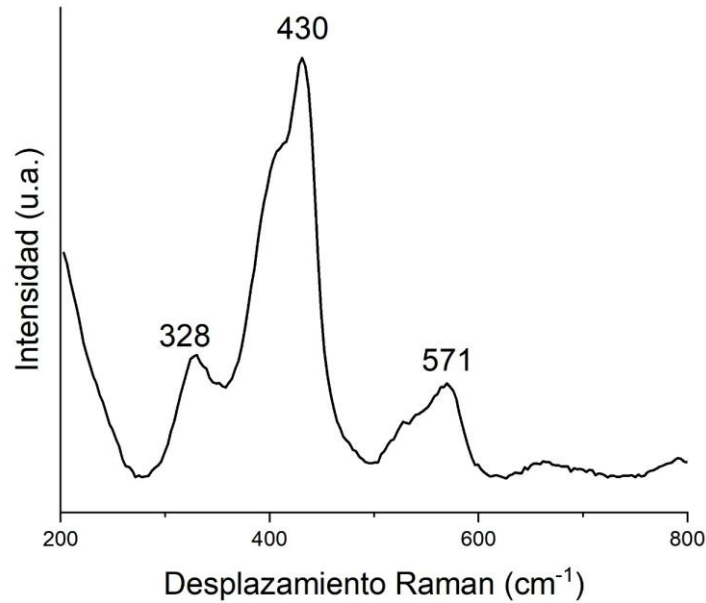


Fig. 1. Espectro Raman de ZnONPs biosintetizadas con el filtrado libre de célula de *M. fragilis*.

Fig. 1. Raman spectrum of biosynthesized ZnONPs obtained using the cell-free filtrate of *M. fragilis*.

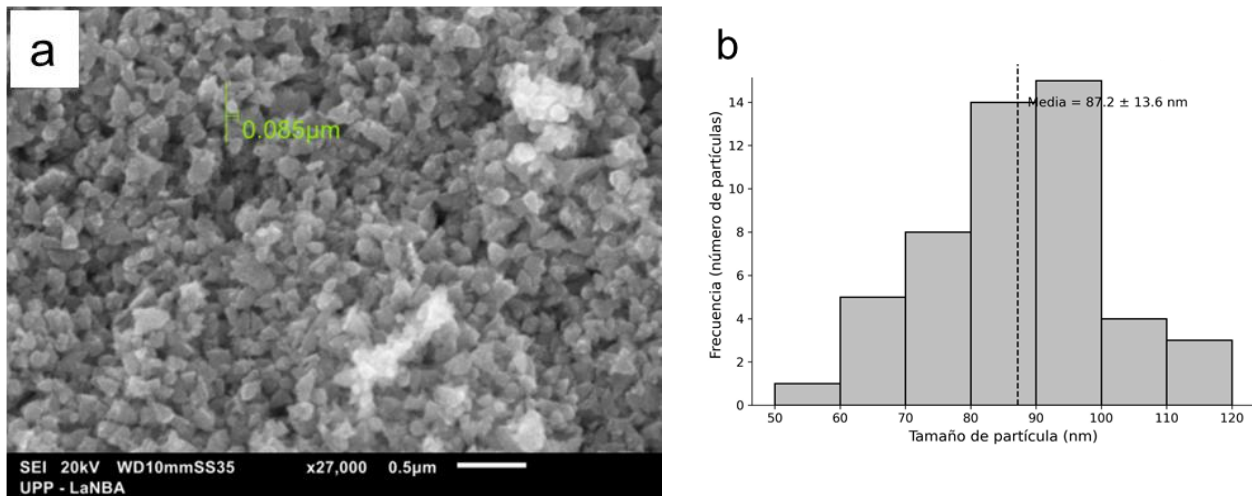


Fig. 2. Micrográficas MEB de las ZnONPs biosintetizadas utilizando el filtrado libre de células de *M. fragilis* (a) y distribución de tamaño de partícula determinada mediante análisis de imagen de las micrográficas MEB con el software ImageJ (n = 50) (b).

Fig. 2. SEM micrographs of biosynthesized ZnONPs obtained using cell-free filtrate of *M. fragilis* (a) and corresponding particle size distribution determined by SEM image analysis with ImageJ software (n = 50) (b).

3.2. Germinación y establecimiento *in vitro* de *A. applanata*

Las semillas de *A. applanata* presentaron un porcentaje de germinación del 76.5 %, equivalente a 78 semillas germinadas de un total de 102 sembradas. La emergencia de la radícula se observó durante las primeras 24 h posteriores a la siembra, lo que sugiere que el corte parcial de la testa pudo favorecer la absorción de agua y aceleró el proceso germinativo.

La primera hoja verdadera emergió entre los días 10 y 13 posteriores al establecimiento, lo que confirmó el desarrollo inicial de las plántulas. Posteriormente, las plántulas continuaron su crecimiento *in vitro* durante seis meses antes de ser utilizadas como fuente de explantes para la etapa de multiplicación.

3.3. Multiplicación de *A. applanata*

La respuesta organogénica de *A. applanata* mostró diferencias significativas entre los tratamientos evaluados (Tabla 2). Los tratamientos correspondientes al punto central del diseño experimental (T9 y T10) presentaron el mayor número de brotes por explante (25.6 ± 1.67 y 25.6 ± 1.14 , respectivamente), sin diferencias estadísticas con T11 (24.2 ± 5.07) ni con T7 (24.8 ± 5.36), los cuales se ubicaron en el mismo grupo de significancia según la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Los tratamientos T3, T4 y T5 presentaron respuestas intermedias (12.4–13.4 brotes por explante), mientras que T6 registró el valor más bajo entre los tratamientos con regeneración de brotes (6.0 ± 0.71). Los tratamientos T1, T2 y T8 no se observó regeneración.

Para la longitud promedio de los brotes también se observaron diferencias significativas entre tratamientos (Tabla 2). El tratamiento T5 (0.025 mg L^{-1} de 2,4-D y 5.0 mg L^{-1} de BAP) produjo la mayor longitud promedio ($2.94 \pm 0.11 \text{ cm}$), estadísticamente superior a la mayoría de los tratamientos. El tratamiento T7 presentó la segunda mayor longitud ($2.44 \pm 0.67 \text{ cm}$), seguido por los tratamientos del punto central ($1.56\text{--}1.84 \text{ cm}$). En contraste, T4 y T6 produjeron brotes cortos (0.60 y 1.00 cm , respectivamente), mientras que T1, T2 y T8 no desarrollaron brotes.

Estos resultados muestran que la combinación de reguladores de crecimiento y ZnONPs afectó de forma diferencial sobre la capacidad regenerativa (número de brotes) y sobre el crecimiento longitudinal. En particular, las condiciones que favorecieron un mayor número de brotes no coincidieron con aquellas que promovieron la mayor elongación.

Tabla 2. Efecto de los reguladores del crecimiento vegetal y de las ZnONPs biosintetizadas utilizando el filtrado libre de células de *M. fragilis* sobre el número y la longitud de brotes de *A. applanata* por tratamiento. Comparación de medias mediante la prueba *HSD de Tukey*; letras diferentes indican diferencias significativas.

Table 2. Effect of plant growth regulators and biosynthesized ZnONPs obtained using the cell-free filtrate of *M. fragilis* on the number and length of *A. applanata* shoots by treatment. Mean comparisons were performed using *Tukey's HSD* test; different letters indicate significant differences.

Tratamiento	2,4-D (mg L ⁻¹)	BAP (mg L ⁻¹)	ZnONPs (mg L ⁻¹)	Número de brotes (media ± DE)	Tukey	Longitud promedio de brotes (cm) (media ± DE)	Tukey
T1	0.0000	0.0	0	0.0 ± 0.00	d	0.00 ± 0.00	F
T2	0.0250	0.0	0	0.0 ± 0.00	d	0.00 ± 0.00	F
T3	0.0000	5.0	0	13.4 ± 2.41	b	1.76 ± 0.70	Bcd
T4	0.0000	0.0	100	12.8 ± 1.92	b	0.60 ± 0.12	Ef
T5	0.0250	5.0	0	12.4 ± 1.14	b	2.94 ± 0.11	A
T6	0.0250	0.0	100	6.0 ± 0.71	c	1.00 ± 0.07	De
T7	0.0000	5.0	100	24.8 ± 5.36	a	2.44 ± 0.67	Ab
T8	0.0250	5.0	100	0.0 ± 0.00	d	0.00 ± 0.00	F
T9	0.0125	2.5	50	25.6 ± 1.67	a	1.78 ± 0.26	Bcd
T10	0.0125	2.5	50	25.6 ± 1.14	a	1.84 ± 0.37	Bc
T11	0.0125	2.5	50	24.2 ± 5.07	a	1.56 ± 0.58	Cd

Valores con letras distintas en la misma columna indican diferencias estadísticas significativas según la prueba de Tukey ($\alpha = 0.05$). Media±DE (n=5 frascos).

El análisis de varianza del diseño factorial 2³ con puntos centrales mostró que, para el número de brotes, los tres factores principales (2,4-D, BAP y ZnONPs) tuvieron efectos altamente significativos sobre la respuesta ($p < 0.001$; Tabla 3). Asimismo, las interacciones dobles (2,4-D × BAP, 2,4-D × ZnONPs y BAP × ZnONPs), así como la interacción triple,

fueron estadísticamente significativas ($p < 0.001$), lo que indica que el efecto de cada factor dependió de la combinación con los demás. De todos los términos evaluados, la interacción 2,4-D $\times$ BAP fue, con diferencia, la de mayor magnitud ($F = 414.76$), con un valor más de cuatro veces superior al del siguiente efecto, por lo que tuvo una contribución predominante en la variación del número de brotes. La prueba de curvatura también fue significativa ($F = 25.35$; $p < 0.001$), lo que sugiere una respuesta no lineal dentro de la región experimental evaluada y confirmando la utilidad de incluir puntos centrales en el diseño. En conjunto, el modelo explicó el 94.55 % de la variación observada ($R^2 = 0.9455$), con un R^2 ajustado de 0.9360, lo que indica un excelente ajuste a los datos experimentales.

Tabla 3. ANOVA del diseño factorial 2^3 con puntos centrales y evaluación de la curvatura para el número de brotes en *A. applanata*.

Table 3. ANOVA of the 2^3 factorial design with center points and curvature analysis for the number of *A. applanata* shoots.

Fuente de variación	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	$p(>F)$
2,4-D (A)	1	664.225	664.225	93.229	<0.001***
BAP (B)	1	632.025	632.025	88.710	<0.001***
ZnONPs (C)	1	198.025	198.025	27.794	<0.001***
A $\times$ B	1	2955.019	2955.019	414.761	<0.001***
A $\times$ C	1	225.625	225.625	31.668	<0.001***
B $\times$ C	1	585.225	585.225	82.141	<0.001***
A $\times$ B $\times$ C	1	245.025	245.025	34.391	<0.001***
Curvatura	1	180.625	180.625	25.352	<0.001***
Error	46	327.733	7.125		
Total (corregido)	54	6013.527			

$R^2 = 0.9455$; R^2 ajustado = 0.9360. *** $p < 0.001$.

Para la longitud promedio de los brotes, el análisis mostró que únicamente el factor BAP presentó un efecto principal significativo ($F = 144.05$; $p < 0.001$), mientras que los efectos individuales de 2,4-D ($p = 0.0688$) y ZnONPs ($p = 0.1595$) no fueron significativos (Tabla 4). Sin embargo, las interacciones dobles (2,4-D $\times$ BAP, 2,4-D $\times$ ZnONPs y BAP $\times$ ZnONPs), así como la interacción triple, resultaron significativas ($p < 0.001$), lo que demuestra que la elongación de los brotes dependió de la acción conjunta de los reguladores de crecimiento y las nanopartículas, más que de la contribución individual de cada factor. La curvatura también fue altamente significativa ($F = 75.85$; $p < 0.001$), confirmando nuevamente un comportamiento no lineal de la respuesta. El modelo explicó el 89.45 % de la variabilidad observada ($R^2 = 0.8945$) y presentó un R^2 ajustado de 0.8761, lo que indica un ajuste adecuado para describir la elongación de los brotes.

En conjunto, estos resultados indican que la regeneración *in vitro* de *A. applanata* estuvo determinada principalmente por la interacción entre los reguladores de crecimiento y las

ZnONPs biosintetizadas. Mientras que el número de brotes fue influenciado significativamente por todos los factores y sus interacciones, la longitud de los brotes dependió principalmente de la concentración de BAP y de las interacciones entre los factores. Estos resultados subrayan la importancia de ajustar el equilibrio hormonal y la concentración de nanopartículas para favorecer la respuesta morfogénica.

Tabla 4. ANOVA del diseño factorial 2^3 con puntos centrales y evaluación de la curvatura para la longitud de brotes en *A. applanata*.

Table 4. ANOVA of the 2^3 factorial design with center points and curvature analysis for *A. applanata* shoot length.

Fuente de variación	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	p(>F)
2,4-D (A)	1	0.462	0.462	3.471	0.0688 ns
BAP (B)	1	19.182	19.182	144.055	<0.001***
ZnONPs (C)	1	0.272	0.272	2.045	0.1595 ns
A × B	1	4.387	4.387	32.948	<0.001***
A × C	1	1.722	1.722	12.934	<0.001***
B × C	1	6.480	6.480	48.665	<0.001***
A × B × C	1	9.312	9.312	69.933	<0.001***
Curvatura	1	10.100	10.100	75.851	<0.001***
Error	46	6.125	0.133		
Total (corregido)	54	58.042			

$R^2 = 0.8945$; R^2 ajustado = 0.8761. ***p < 0.001; ns = no significativo

Los gráficos de interacción (Figura 3) mostraron que la respuesta regenerativa dependió de la combinación de los tres factores experimentales, más que de la acción individual de cada uno. Para el número de brotes, la interacción entre 2,4-D y BAP evidenció que la presencia simultánea de ambos reguladores modificó la respuesta de manera no aditiva, mientras que las combinaciones de BAP con ZnONPs y de 2,4-D con ZnONPs modificaron la magnitud de la proliferación. Un comportamiento similar se observó para la longitud promedio de los brotes, cuya respuesta dependió del equilibrio entre reguladores de crecimiento y las ZnONPs.

El análisis de Pareto de los efectos estandarizados fue consistente con los resultados del ANOVA (Figura 4). Para el número de brotes, los efectos de mayor magnitud correspondieron a la curvatura y a la interacción A×B, seguidos por los factores principales A y B, mientras que las restantes interacciones presentaron contribuciones menores pero significativas. En la longitud promedio de los brotes, el factor BAP (B) fue el efecto dominante, seguido por la interacción A×B×C, la interacción B×C y la interacción A×C. Estos resultados indican que el crecimiento de los brotes dependió principalmente del balance hormonal y de su interacción con las ZnONPs.

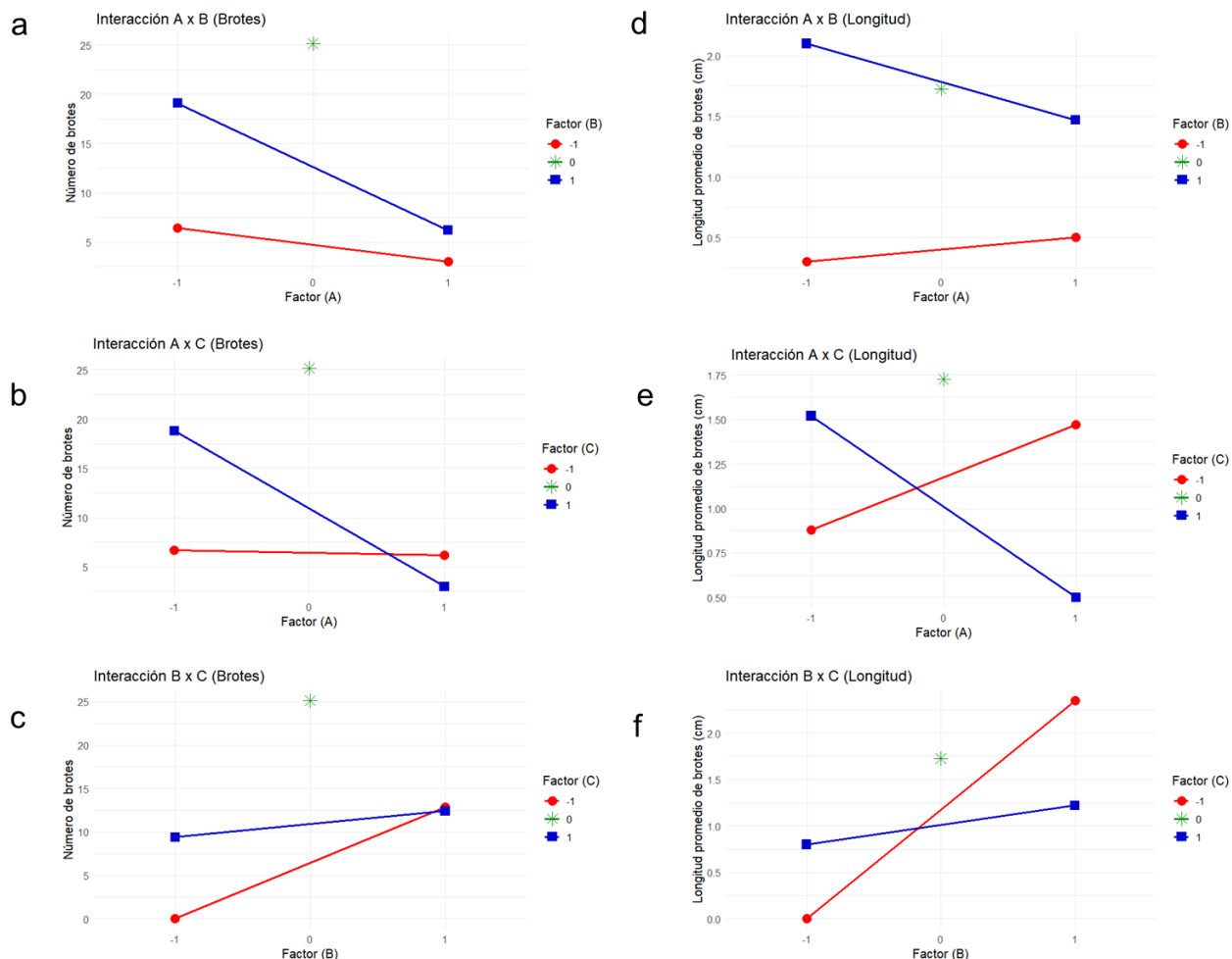


Fig. 3. Gráficos de interacción entre los factores 2,4-D (a), BAP (b) y ZnONPs (c) para el número de brotes (a–c) y la longitud promedio de brotes (d–f) de *A. applanata*, obtenidos mediante un diseño factorial 2^3 con tres puntos centrales. Los paneles corresponden a las interacciones A $\times$ B (a, d), A $\times$ C (b, e) y B $\times$ C (c, f).

Fig. 3. Interaction plots for the factors 2,4-D (a), BAP (b), and ZnONPs (c) showing the number of shoots (a–c) and mean shoot length (d–f) of *A. applanata*, obtained from a 2^3 factorial design with three center points. The panels correspond to the A $\times$ B (a, d), A $\times$ C (b, e), and B $\times$ C (c, f) interactions.

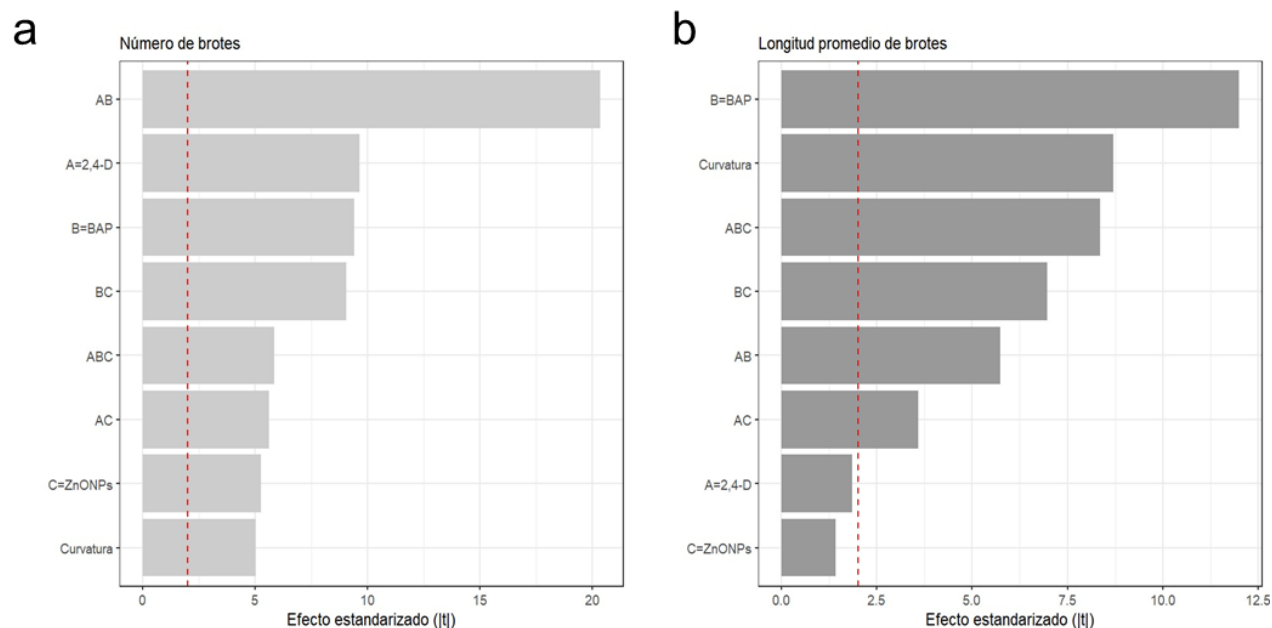


Fig. 4. Diagramas de Pareto de los efectos estandarizados de los factores principales, sus interacciones y la curvatura sobre el número de brotes (a) y la longitud promedio de los brotes (b) de *A. applanata*, obtenidos mediante un diseño factorial 2^3 con tres puntos centrales. A = 2,4-D; B = BAP; C = ZnONPs.

Fig. 4. Pareto charts of the standardized effects of the main factors, their interactions, and curvature on the number of shoots (a) and mean shoot length (b) of *A. applanata*, obtained from a 2^3 factorial design with three center points. A = 2,4-D; B = BAP; C = ZnONPs.

3.3.2. Respuesta morfogénica y variables de calidad del cultivo

La respuesta morfogénica de *A. applanata* mostró una fuerte dependencia de la combinación entre reguladores de crecimiento y ZnONPs, con diferencias claras entre los tratamientos evaluados (Tabla 5). La presencia de BAP, sola o combinada, indujo organogénesis directa en el 100 % de los explantes (T3, solo BAP; T5, 2,4-D $\times$ BAP; y T7, BAP $\times$ ZnONPs), independientemente de la presencia de ZnONPs. Esta respuesta se caracterizó por la formación de brotes adventicios a partir del tejido meristemático basal, sin fase intermedia de callo.

En contraste, la incorporación de ZnONPs en ausencia de BAP se asoció con cambios en la ruta morfogénica. Su aplicación individual (T4) o en combinación con 2,4-D (T6) condujo principalmente a callogénesis (70%), acompañada de organogénesis indirecta (30%). La combinación triple de reguladores de crecimiento y ZnONPs (T8) indujo exclusivamente callogénesis (100%), sin regeneración de brotes.

Los tratamientos correspondientes al punto central del diseño experimental (T9, T10 y T11) presentaron organogénesis indirecta en el 100% de los explantes, caracterizada por la formación de callo como fase intermedia previa a la regeneración de brotes.

Los índices de vitrificación y contaminación microbiana se presentan de forma descriptiva debido a la naturaleza categórica de estas variables (Tabla 5). La vitrificación estuvo ausente en la mayoría de los tratamientos; únicamente el tratamiento T4, suplementado con 100 mg L⁻¹ de ZnONPs, presentó síntomas de hiperhidricidad en 8 de los 10 explantes evaluados (80 %). Por el contrario, los tratamientos correspondientes al punto central (T9–T11) no mostraron vitrificación. En cuanto a la contaminación microbiana, el control absoluto (T1) presentó el mayor número de frascos contaminados (4 de 5; 80 %), mientras que los tratamientos que incluyeron ZnONPs registraron entre uno y dos frascos contaminados (20–40 %). En conjunto, estos resultados sugieren que la incorporación de ZnONPs redujo la incidencia de contaminación microbiana sin incrementar la vitrificación en las concentraciones intermedias evaluadas.

La respuesta morfogénica observada coincidió con la clasificación realizada durante la evaluación de los explantes (Figura 5). La organogénesis directa se caracterizó por la emisión de brotes adventicios desde la región meristemática basal (a), mientras que en la organogénesis indirecta la regeneración ocurrió a partir de tejido calloso previamente formado (b). En otros tratamientos, únicamente se observó proliferación de callo sin diferenciación de brotes durante el periodo experimental (c). Bajo las condiciones más favorables del diseño experimental, se obtuvo una elevada proliferación de brotes (d), cuya diferenciación estructural fue observada mediante microscopía (objetivo 40×) en los tratamientos T2, T4 y T5 (e-g). Estos resultados sugieren que la transición de una estructura indiferenciada (callo) hacia patrones morfogénicos complejos estuvo asociada a la combinación de suplementación hormonal y ZnONPs, en un patrón consistente con una respuesta dosis-dependiente de tipo bifásico.

Tabla 5. Efecto del diseño experimental sobre la respuesta morfogénica y los parámetros de calidad del cultivo (vitrificación y contaminación).

Table 5. Effect of the experimental design on the morphogenetic response and culture quality parameters (hyperhydricity and contamination).

Tratamiento	Vitrificación (explantos)	Contaminación (frascos)	Organogénesis directa	Organogénesis indirecta	Callogé- nesis
T1 (Control)	0/10 (0%)	4/5 (80%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)
T2 (2,4-D)	0/10 (0%)	3/5 (60%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)
T3 (BAP)	0/10 (0%)	3/5 (60%)	10/10 (100%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)
T4 (ZnONPs)	8/10 (80%)	1/5 (20%)	0/10 (0%)	3/10 (30%)	7/10 (70%)
T5 (2,4-D + BAP)	0/10 (0%)	2/5 (40%)	10/10 (100%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)
T6 (2,4-D + ZnONPs)	0/10 (0%)	1/5 (20%)	0/10 (0%)	3/10 (30%)	7/10 (70%)
T7 (BAP + ZnONPs)	0/10 (0%)	1/5 (20%)	10/10 (100%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)
T8 (2,4-D + BAP + ZnONPs)	0/10 (0%)	1/5 (20%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)	10/10 (100%)
T9 (Central)	0/10 (0%)	2/5 (40%)	0/10 (0%)	10/10 (100%)	0/10 (0%)
T10 (Central)	0/10 (0%)	2/5 (40%)	0/10 (0%)	10/10 (100%)	0/10 (0%)
T11 (Central)	0/10 (0%)	1/5 (20%)	0/10 (0%)	10/10 (100%)	0/10 (0%)

Nota: Los valores de vitrificación y respuesta morfogénica se expresan como número de explantes respecto al total evaluado (n = 10), seguido del porcentaje correspondiente. La contaminación se expresa como número de frascos contaminados respecto al total de frascos por tratamiento (n = 5). Cada explante fue asignado a una única categoría morfogénica predominante al finalizar el periodo experimental.

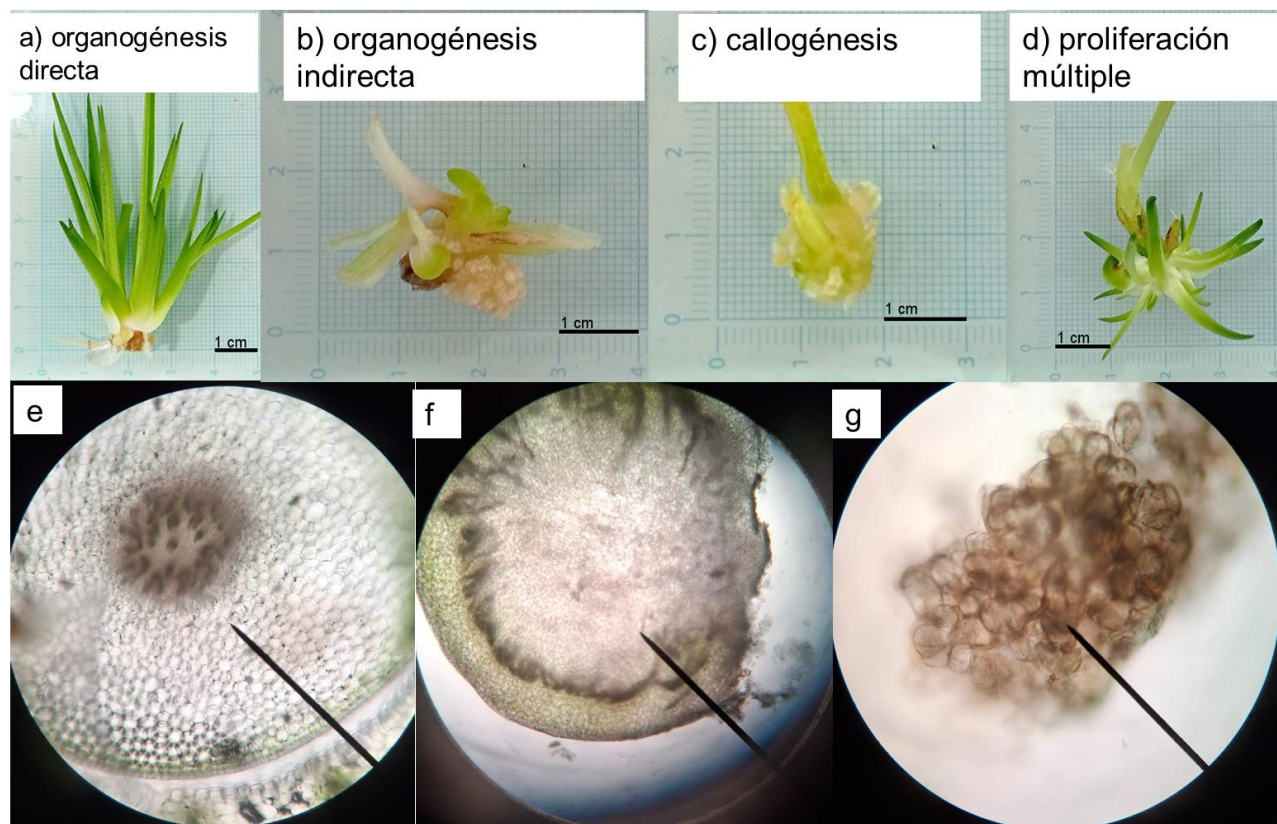


Fig. 5. Respuestas morfogénicas observadas durante la multiplicación *in vitro* de *A. applanata* en medios suplementados con reguladores del crecimiento vegetal y ZnONPs (a–d). Observaciones microscópicas (objetivo 40×) de la organización estructural de los explantes en los tratamientos T2 (e), T4 (f) y T5 (g), que ilustran la transición de estructuras indiferenciadas (callo) hacia patrones morfogénicos más complejos, consistente con una respuesta dosis-dependiente a la suplementación hormonal y de ZnONPs (e–g). Barras de escala (a–d) = 1 cm; aumento del objetivo en (e–g) = 40×.

Fig. 5. Morphogenetic responses observed during the *in vitro* multiplication of *A. applanata* in media supplemented with plant growth regulators and ZnONPs (a–d). Microscopic observations (40× objective) of the structural organization of explants in treatments T2 (e), T4 (f), and T5 (g), illustrating the transition from undifferentiated structures (callus) to more complex morphogenetic patterns, consistent with a dose-dependent response to hormonal supplementation and ZnONPs (e–g). Scale bars (a–d) = 1 cm; objective magnification in (e–g) = 40×.

4. Discusión

La regeneración *in vitro* de *A. applanata* estuvo determinada por la interacción entre los reguladores de crecimiento vegetal y las ZnONPs biosintetizadas. El análisis factorial 2^3 con

puntos centrales mostró que tanto los efectos principales como varias de sus interacciones influyeron significativamente sobre el número y la longitud de los brotes, lo que indica que la respuesta morfogénica dependió del equilibrio entre la regulación hormonal y la incorporación de ZnONPs al medio de cultivo. Los modelos obtenidos explicaron una elevada proporción de la variabilidad experimental ($R^2 = 0.9455$ y R^2 ajustado = 0.9360 para número de brotes; $R^2 = 0.8945$ y R^2 ajustado = 0.8761 para longitud de brotes), lo que respalda la capacidad del diseño experimental para describir la respuesta biológica del sistema dentro de las condiciones evaluadas.

Los resultados obtenidos resaltan el papel fundamental de BAP en la inducción de la organogénesis, ya que los tratamientos que incluyeron esta citocinina favorecieron consistentemente la formación de brotes. No obstante, la respuesta regenerativa no dependió únicamente de la presencia de BAP, sino también de su interacción con 2,4-D y las ZnONPs. El análisis de varianza y los diagramas de Pareto mostraron que, además de los efectos principales, las interacciones entre los factores explicaron una parte importante de la variabilidad observada, lo que sugiere que la regeneración de *A. applanata* responde a un equilibrio hormonal complejo más que al efecto aislado de un regulador de crecimiento. Este comportamiento coincide con lo reportado para otras especies del género *Agave*, donde la relación auxina–citocinina constituye el principal determinante de la organogénesis *in vitro* (Sánchez-Madrid *et al.*, 2016; Cardoso *et al.*, 2018; Rodríguez-Garay y Rodríguez-Domínguez, 2018; Parismoreno-Rivas *et al.*, 2024).

Las ZnONPs biosintetizadas actuaron como un componente bioactivo capaz de modificar la respuesta morfogénica. Los tratamientos correspondientes al punto central del diseño experimental (0.0125 mg L^{-1} de 2,4-D, 2.5 mg L^{-1} de BAP y 50 mg L^{-1} de ZnONPs) produjeron la mayor proliferación de brotes (25.6 brotes por explante), mientras que la combinación de 0.025 mg L^{-1} de 2,4-D y 5.0 mg L^{-1} de BAP favoreció la mayor elongación (2.94 cm). Estos resultados indican que las condiciones óptimas para incrementar el número de brotes no necesariamente son las mismas que promueven su crecimiento longitudinal, lo cual sugiere que ambas respuestas están reguladas por procesos fisiológicos parcialmente distintos.

El análisis morfogénico permitió comprender mejor la influencia de las ZnONPs sobre las rutas de diferenciación celular. La presencia de BAP, sola o en combinación con otros factores, indujo organogénesis directa en el 100 % de los explantes, caracterizada por la formación de brotes adventicios sin una fase previa de callo. En contraste, cuando las ZnONPs fueron incorporadas en ausencia de BAP predominó la callogénesis, mientras que los tratamientos del punto central favorecieron exclusivamente la organogénesis indirecta. Estos resultados sugieren que las ZnONPs no actúan como inductores directos de la regeneración, sino como moduladores de la vía morfogénica, cuya respuesta depende del contexto hormonal del medio de cultivo.

Este comportamiento coincide con diversos estudios que describen el efecto bioestimulante de las nanopartículas de óxido de zinc en cultivos de tejidos vegetales. En *Chenopodium quinoa*, así como en especies hortícolas y frutales, concentraciones moderadas de ZnONPs incrementan la proliferación de brotes y mejoran la eficiencia regenerativa, mientras que dosis elevadas generan respuestas inhibitorias asociadas con estrés oxidativo (Gethami y

El Sayed, 2020; Nugrahani y Moeljani, 2024; Ghareb *et al.*, 2025). El zinc participa como cofactor en numerosas enzimas relacionadas con la división celular, el metabolismo antioxidante y la síntesis de proteínas; sin embargo, concentraciones excesivas pueden favorecer la acumulación de especies reactivas de oxígeno y alterar la integridad de membranas celulares, afectando negativamente la diferenciación de tejidos (Rastogi *et al.*, 2017; Bouhadi *et al.*, 2025).

En el presente estudio, la concentración más alta de ZnONPs (100 mg L⁻¹) promovió principalmente la formación de callo en ausencia de BAP (T4 y T6); el tratamiento con ZnONPs como único factor (T4) fue el único con elevada incidencia de vitrificación. Este comportamiento fue consistente con una respuesta dosis-dependiente, en la que las concentraciones intermedias favorecen la regeneración, mientras que dosis elevadas alteran el desarrollo normal del tejido vegetal. En contraste, los tratamientos del punto central no presentaron vitrificación y mostraron la mayor eficiencia regenerativa, lo que sugiere la existencia de un intervalo favorable de concentración para el uso de ZnONPs durante la micropropagación de *A. applanata*.

La contaminación microbiana también mostró una tendencia decreciente en los tratamientos suplementados con ZnONPs respecto al control absoluto. Aunque esta variable fue evaluada únicamente de forma descriptiva y no fue sometida a un análisis estadístico, la reducción observada concuerda con la reconocida actividad antimicrobiana del óxido de zinc, atribuida a la liberación de iones Zn²⁺ y a la generación de especies reactivas de oxígeno capaces de inhibir el crecimiento de bacterias y hongos contaminantes. Este efecto representa un beneficio adicional para los protocolos de cultivo de tejidos, ya que puede contribuir a disminuir las pérdidas por contaminación sin afectar la capacidad regenerativa cuando se emplean concentraciones adecuadas (Nugrahani y Moeljani, 2024).

En conjunto, los resultados demuestran que la respuesta morfogénica de *A. applanata* depende de la interacción entre los reguladores de crecimiento y las ZnONPs biosintetizadas. Mientras que el balance entre auxinas y citocininas constituye el principal determinante de la organogénesis, las ZnONPs actúan como un modulador fisiológico que potencia o limita la respuesta regenerativa según la concentración utilizada. Estos hallazgos aportan evidencia de que la integración de nanotecnología y reguladores de crecimiento representa una estrategia promisorio para fortalecer los protocolos de micropropagación y contribuir al desarrollo de estrategias de conservación y aprovechamiento sostenible de especies endémicas del género *Agave*.

5. Conclusiones

La incorporación de nanopartículas biosintetizadas de óxido de zinc al medio de cultivo modificó significativamente la respuesta morfogénica durante la multiplicación *in vitro* de *A. applanata*. El análisis factorial demostró que tanto los efectos principales como las interacciones entre 2,4-D, BAP y las ZnONPs influyeron significativamente en el número y la longitud de los brotes, lo que confirma que la regeneración depende del equilibrio entre los reguladores de crecimiento y la concentración de nanopartículas.

La combinación de 0.0125 mg L⁻¹ de 2,4-D, 2.5 mg L⁻¹ de BAP y 50 mg L⁻¹ de ZnONPs constituyó la condición más favorable dentro de las evaluadas para la proliferación de brotes, alcanzando un promedio de 25.6 brotes por explante después de 45 días de cultivo. En contraste, la mayor elongación de los brotes (2.94 cm) se obtuvo con la combinación de 0.025 mg L⁻¹ de 2,4-D y 5.0 mg L⁻¹ de BAP, lo que indica que los requerimientos fisiológicos para proliferación y crecimiento longitudinal no fueron equivalentes.

El análisis morfogénico mostró que la presencia de BAP favoreció la organogénesis directa, mientras que las ZnONPs modificaron la vía de regeneración dependiendo del contexto hormonal. Las concentraciones intermedias promovieron organogénesis indirecta altamente eficiente, mientras que la concentración de 100 mg L⁻¹ favoreció la formación de callo y aumentó la incidencia de vitrificación, en concordancia con una respuesta dosis-dependiente de tipo bifásico.

Adicionalmente, los tratamientos suplementados con ZnONPs presentaron una menor incidencia descriptiva de contaminación microbiana respecto al control, lo que sugiere un posible efecto antimicrobiano que merece ser evaluado mediante estudios específicos.

En conjunto, este trabajo demuestra que las ZnONPs biosintetizadas constituyen una herramienta prometedora para mejorar protocolos de micropropagación de *A. applanata*. La integración de nanotecnología y reguladores de crecimiento permitió incrementar la eficiencia regenerativa y proporciona una base experimental para el desarrollo de estrategias dirigidas a la propagación masiva, conservación *ex situ* y aprovechamiento sostenible de esta especie endémica mexicana.

Agradecimientos

Los autores agradecen a SECIHTI por la beca otorgada a AICM con el número 858302.

Contribución de los autores

A. Canales-Mendoza: Metodología. Análisis formal. Investigación. Redacción.
M. Villanueva-Ibáñez. Conceptualización. Recursos. Supervisión, Revisión y edición.
Y. Mercado-Flores: Supervisión, Revisión y edición.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Referencias

Abdalla, N., El-Ramady, H., Seliem, M.K., El-Mahrouk, M.E., Taha, N., Bayoumi, Y., Shalaby, T.A. and Dobránszki, J. 2022. An academic and technical overview on plant

micropropagation challenges. Horticulturae. 8(8), 677.
<https://doi.org/10.3390/horticulturae8080677>

Abreu, E., Sosa, M., Ascunce, G. and González, G. 2016. Efecto de antibióticos en la propagación in vitro de *Agave fourcroydes* Lem. Biotecnol Veg. 16, 31–36.

Agarwal, H., Kumar, V. and Rajeshkumar, S. 2017. A review on green synthesis of zinc oxide nanoparticles – an eco-friendly approach. Resour-Effic Technol. 3(4), 406–413.
<https://doi.org/10.1016/j.reffit.2017.03.002>

Alamilla-Martínez, D.G., Rojas-Avelizapa, N.G., Domínguez-López, I., Pool, H. and Gómez-Ramírez, M. 2019. Biosynthesis of iron nanoparticles (FeNPs) by *Alternaria alternata* MVSS-AH-5. Mex. J. Biotechnol. 4(4), 1–14. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2019.4.4.1>

Ángeles, B.V., Mercado, Y., García, A., Rodríguez, B., Anducho, M.A. and Álvarez, J. 2017. Embriogénesis somática: una alternativa para el cultivo masivo del maguey pulquero *Agave salmiana* var. *salmiana*. In F. Trejo (Ed.), *Ciencias Multidisciplinarias (SIMCI)*, Proceedings ECOFAN-México, 38–50.

Ávila, M.A., Mendoza, B., Gómez, E. and Hernández, E.M. 2017. *Comadia redtenbacheri*, individuo del Altiplano Hidalguense. *Ciencias Multidisciplinarias (SIMCI)*, Proceedings ECOFAN-México.

Bautista-Castellanos, A.I., Enríquez-del Valle, J.R., Velasco-Velasco, V.A. and Rodríguez-Ortiz, G. 2021. Enraizado de brotes in vitro y aclimatación de plantas de *Agave potatorum* Zucc. Ecosist Recur Agropecu. 7(3), e2618. <https://doi.org/10.19136/era.a7n3.2618>

Balusamy, S.R., Joshi, A.S., Perumalsamy H, Mijakovic I, Singh P. 2023. Advancing sustainable agriculture: a critical review of smart and eco-friendly nanomaterial applications. J Nanobiotechnology. 21, 372. <https://doi.org/10.1186/s12951-023-02135-3>

Bouhadi, M., Javed, Q., Jakubus, M., Elkouali, M., Fougrach, H., Ansar, A., Ban, S.G., Ban, D., Heath, D. and Černe, M. 2025. Nanoparticles for sustainable agriculture: assessment of benefits and risks. Agronomy. 15(5), 1131. <https://doi.org/10.3390/agronomy15051131>

Canales-Mendoza, A.I., Villanueva-Ibáñez, M., Tovar-Jiménez, X. and Álvarez-Cervantes, J. 2023. Effect of fungal extracellular biogenic zinc oxide nanoparticles on the in vitro multiplication of *Agave salmiana* shoots. Plant Cell Tissue Organ Cult. 155, 479–491. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02589-1>

Cardoso, J.C., Sheng Gerald, L.T., Teixeira da Silva, J.A. 2018. Micropropagation in the twenty-first century. Methods Mol Biol. 1815, 17–46. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_2

Castro, T.J., Franco, A., Pessoni, H.V.S., Rodrigues, P.A.M., Morais, P.C. and da Silva, S.W. 2017. Investigation of additional Raman modes in ZnO and Eu_{0.01}Zn_{0.99}O nanoparticles

synthesized by solution combustion method. J Alloys Compd. 691, 416–421. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2016.08.297>

Chávez-Ortiz, L.I., Morales-Domínguez, J.F., Rodríguez-Sahagún, A. and Pérez-Molphe-Balch, E. 2020. *In vitro* propagation of *Agave guiengola* using semisolid medium and temporary immersion bioreactors. Phytom (B Aires). 90, 1003–1013. <https://doi.org/10.32604/phyton.2021.012862>

Elemike, E.E., Uzoh, I.M., Onwudide, D.C. and Babalola, O.O. 2019. The role of nanotechnology in the fortification of plant nutrients and improvement of crop production. Appl. Sci. 9, 499–509. <https://doi.org/10.3390/app9030499>

Espinosa-Leal, C.A., Puente-Garza, C.A., García-Lara, S. 2018. *In vitro* plant tissue culture: means for production of biological active compounds. Planta. 248(1):1-18. <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2910-1>

García-Mendoza, A.J. 2007. Los agaves de México. Ciencias, 87, 14–23.

García-Montes, M.A., Octavio-Aguilar, P., Sánchez-González, A. 2025. The impact of chinicuil extraction (*Comadia redtenbacheri*) on demographic traits of *Agave applanata*. Bot Sci. 103(1), 104–119. <https://doi.org/10.17129/botsci.3570>

Gethami, F.R., El Sayed, H.E.S.A. 2020. Assessment of various concentrations of ZnO nanoparticles on micropropagation of *Chenopodium quinoa*. J Adv Biol Biotechnol. 23, 33–42. <https://doi.org/10.9734/jabb/2020/v23i630162>

Ghareb, H.E.S., Mustafa, S.S. and Ibrahim, S.D. 2025. *In vitro* propagation and assessment of genetic stability in *Eriobotrya japonica* as affected by zinc oxide nanoparticles. In Vitro Cell Dev Biol Plant. 61, 631–645. <https://doi.org/10.1007/s11627-024-10502-4>

Gunaseena, M.D.K.M., Gunaseena, M.D., Alahakoon, A.H., Polwaththa, K., Galpaya, G., Priyanjani, H.A., Koswattage, K.R. and Senarath, W. 2024. Transforming plant tissue culture with nanoparticles: a review. Plant Nano Biol. 10, 100102. <https://doi.org/10.1016/j.plana.2024.100102>

Hussain, I., Singh, N.B., Singh, A., Singh, H. and Singh, S.C. 2016. Green synthesis of nanoparticles and its potential application. Biotechnol Lett. 38(4), 545–560. <https://doi.org/10.1007/s10529-015-2026-7>

Llanderal-Cázares, C., Castro-Torres, R., Miranda-Perkins, K. 2017. Bionomics of *Comadia redtenbacheri*. SHILAP Rev Lepid. 45, 373–383. <https://doi.org/10.57065/shilap.928>

Milani, N., Hettiarachchi, G.M., Kirby, J.K., Beak, D.G., Stacey, S.P. and McLaughlin, M.J. 2015. Fate of zinc oxide nanoparticles coated onto macronutrient fertilizers in an alkaline calcareous soil. PLoS ONE, 10, e0126275. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126275>

Molina-Vega, A., Hernández-Domínguez, E.M., Villa-García, M. and Álvarez-Cervantes, J. 2021. *Comadia redtenbacheri* and *Aegiale hesperiaris* as edible insects of *Agave salmiana*. Int J Trop Insect Sci. 41, 1977–1988. <https://doi.org/10.1007/s42690-020-00396-1>

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Plant Physiol. 15, 473-497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>

Nugrahani, P., Moeljani, I. R. and Makhziah, M. 2024. The impact of adding nanoparticles to the media to speed up the *in vitro* multiplication stage of banana explants. Acta Hortic. (1404), 1477–1483. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2024.1404.205>

Parismoreno-Rivas, L.L., Barcia-Jalca, B.S., Medina-Litardo, R.C. and Pérez-Almeida, I.B. 2024. Effect of different concentrations of benzylaminopurine for the *in vitro* propagation of *Vanilla tahitensis* (J. W. Moore). Mex. J. Biotechnol. 9(2), 34-50. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2024.9.2.34>

Prasad, A., Sidhic, J., Sarbadhikary, P., Narayanankutty, A., George, S., George, B.P. and Abrahamse, H. 2024. Role of metal nanoparticles in organogenesis, secondary metabolite production and genetic transformation of plants under *in vitro* condition: a comprehensive review. Plant Cell Tissue Organ Cult. 158(2), Article 33. <https://doi.org/10.1007/s11240-024-02833-2>

Rastogi, A., Zivcak, M., Sytar, O., Kalaji, H.M., He, X., Mbarki, S., and Brestic, M. 2017. Impact of metal and metal oxide nanoparticles on plant: A critical review. Front Chem. <http://doi.org/10.3389/fchem.2017.00078>

Reynoso-Santos, R., García-Mendoza, A.J., López-Báez, W. 2012. Identificación taxonómica de agaves usados para licor comiteco en Chiapas. Agro productividad. 5, 9–1. <https://doi.org/10.22004/AG.ECON.352233>

Rodríguez-Aguilar, S.P., Muñoz-Olvera, A., Durán-Flores, R., Hernández-Feregrino, J., Limón-Medrano, J.P. and Hernández-Hernández, H.M. 2021. Micropropagación como alternativa para evitar la extinción de plantas endémicas. J Bioengineering Biomed Res. 5(3), 1–15.

Rodríguez-Domínguez, J.M., Gordillo-Tello, A.B., Soto-Carrasquel, A., Barba-González, R. and Rodríguez-Garay, B. 2018. Determination of chromosome number in *Agave* species. In Sustainable and Integrated Use of *Agave*. CIATEJ.

Rodríguez-Garay, B., Rodríguez-Domínguez, J.M. 2018. Micropropagation of *Agave* species. In: Loyola-Vargas, V., Ochoa-Alejo, N. (eds) Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology, vol 1815. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_8

Romero-Jiménez, H., Cadena, J., Tarango, L.A. Ugalde, S., Olmos, G. and Hernández, E. 2025. Insectos comestibles: perspectiva socioeconómica. ASyD. 22(2), 278–300. <https://doi.org/10.22231/asyd.v22i2.1752>

Sánchez-Madrid, C. del R., Zavala-Castillo, S. and Garrido-Gutiérrez, M.I. 2016. Food interest *Agave salmiana*'s fructans obtention using plant tissue culture techniques. Mex. J. Biotechnol. 1(1), 170–176. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2016.1.1.170-176>

Santacruz-Ruvalcaba, F., Castañeda-Nava, J.J., Villanueva-González, J.P., García-Sahagún, M.L., Portillo, L. and Contreras-Pacheco, M.L. 2022. Micropropagación de *Agave maximiliana* Baker por proliferación de yemas axilares. Polibotánica. (54), 139-151. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.54.9>

Sudheer, W.N., Praveen, N., Al-Khayri, J.M., Jain, S.M. 2022. Role of plant tissue culture medium components. Elsevier eBooks. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-90795-8.00012-6>